

## POLYMORPHISME ENZYMATIQUE ET MORPHOLOGIQUE COMPARÉ CHEZ *CHARA ASPERA* ET *C. GALIODES* (CHAROPHYCEAE) EN CAMARGUE

Anne BONIS<sup>1\*</sup>, Pierrette GEMAYEL<sup>2</sup> et Patrick GRILLAS<sup>3</sup>

1. CEFE-CNRS, BP 5051, 34033 Montpellier Cedex 01, France.
2. Institut des Sciences de l'Evolution, URA 327, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05, France.
3. Station Biologique, Tour du Valat, 13200 Le Sambuc, France.

\* adresse actuelle: Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Downing Street, Cambridge CB2 3EA, U.K.

**RÉSUMÉ** - Le statut systématique de *Chara aspera* Detharding ex Willdenow et *Chara galioides* de Candolle n'est pas clairement établi dans les flores. En Camargue, leur distinction repose uniquement sur le diamètre des anthéridies (supérieur chez *Chara galioides*). Nous avons cherché des éléments permettant de documenter le statut respectif de ces deux taxons et de tester la valeur du diamètre des anthéridies comme critère de détermination. Six populations différentes ont été étudiées, provenant de marais temporaires oligohalins de Camargue. Pour chaque individu analysé, nous avons comparé le diamètre moyen des anthéridies avec son génotype, qui est constitué par les niveaux de migration sur gel d'électrophorèse des enzymes suivantes: les phosphatases acides, la phosphoglucomutase, la phosphogluco-isomérase et l'isocitrate-déshydrogénase. Deux taxons, parfois sympatriques, peuvent être distingués sur la base de la taille de leurs anthéridies et de génotypes caractéristiques. Les individus qui n'appartiennent ni à l'un ni à l'autre des taxons pourraient résulter de brassage génétique partiel entre eux.

**ABSTRACT** - The systematics of *Chara aspera* Detharding ex Willdenow and *C. galioides* de Candolle remains not clear. In the Camargue, their identification is based only on the diameter of the antheridia, which is larger for *Chara galioides*. In this study we have examined morphological and enzyme variation in the two species and test the validity of the above morphological criteria. Six populations from oligohaline temporary marshes have been studied. The morphology and the enzyme genotype of each individual for 4 enzyme loci, acid phosphatase, phosphoglucomutase, phosphogluco-isomerase and isocitrate-dehydrogenase, have been compared. Two taxa, which occasionally occur in sympatry, could be distinguished on the basis of antheridia diameter and enzyme genotype. Some individuals, which belong to neither taxon may be the product of partial genetic mixing between them.

**MOTS CLÉS** : charophytes, diamètre des anthéridies, électrophorèse, enzymes, populations, salinité, systématique.

## INTRODUCTION

La systématique des charophytes actuelles a été revue par Corillion (1957) pour la partie européenne et Wood & Imahori (1965) qui ont fourni une flore mondiale des charophytes. Dans les marais oligo-halins de Camargue, deux taxons sont fréquemment rencontrés: *Chara aspera* Detharding ex Willdenow et *Chara galioides* de Candolle, dont le statut taxonomique diffère considérablement selon la flore de référence consultée. Corillion (1957) leur donne le statut d'espèce tandis que Wood & Imahori (1965) les réunissent comme deux formes de *Chara aspera*, ce taxon étant lui-même inclus dans *Chara globularis* Thuillier. Aucun critère sûr et utilisable n'est fourni pour distinguer les individus mâles avant la reproduction ni les individus femelles de chaque taxon (Corillion, 1957). Ces deux taxons sont dioïques et présentent le même type de cortication (triplostique), la cortication étant un des critères majeurs pour la détermination des charophytes. *Chara galioides* est décrite comme une plante plus robuste que *Chara aspera* (Corillion, 1957), mais tous les auteurs soulignent la très forte variabilité morphologique de *Chara aspera* et des charophytes en général. Cette variabilité a conduit à de nombreuses divisions de systématique (Wood & Imahori, 1965). Dans les deux flores, la distinction de ces deux taxons repose essentiellement sur le diamètre des anthéridies:

- de 390 à 600 microns (Wood & Imahori, 1965), de 400 à 600 microns (Corillion, 1957) pour *Chara aspera*.

- de 800 à 1100 microns (Wood & Imahori, 1965) ou de 850 à 1000 microns (Corillion, 1957) pour *Chara galioides*.

Corillion souligne cependant que ces caractères de discrimination entre *Chara aspera* et *Chara galioides* sont souvent pris en défaut, HY (1913) suspectant déjà que *Chara galioides* ne soit qu'une "race" plus robuste et méridionale de *Chara aspera*.

Un second critère donné par les flores pour différencier ces deux taxons est l'existence de bulbilles présents uniquement sur les rhizoïdes de *Chara aspera*. Corillion (1957) note que ce caractère n'existe pas pour le type *asperula* de *Chara aspera* et qu'il "ne s'agit donc pas d'avantage d'un argument décisif". Nous n'avons pour notre part jamais trouvé de bulbilles sur des *Chara aspera* en Camargue (sud de la France).

En Camargue, *Chara aspera* et *Chara galioides* ont été observées à plusieurs reprises par Tallon (1957), Corillion & Guerlesquin (1959), Aguesse & Bigot (1960), Corillion (1961), Molinier & Tallon (1970) et Guerlesquin & Podlejski (1980), parfois dans les mêmes sites (Guerlesquin, comm. pers.).

*Chara galioides* est considérée comme plus halo-tolérante que *Chara aspera*: cette préférence ne peut être retenue comme critère de différenciation, d'autant plus que l'eau des marais temporaires de Camargue est souvent d'une salinité qui permet aux deux taxons d'être présents (entre 0 et 6g/l Cl<sup>-</sup>, Grillas, 1990). Corillion (1957) et Guerlesquin (1958) notent que les anthéridies de fort diamètre se trouvent systématiquement dans les milieux salés ou saumâtres. La variation de la taille des organes reproducteurs avec le milieu a été bien documentée par Soulié-Marsche (1979) qui a souligné l'importance des variations morphologiques des oospores ou gyrogonites (qui présentent une structure externe calcifiée) en fonction de la teneur en carbonate de calcium de l'eau. Il est probable que la salinité de l'eau augmente le diamètre des anthéridies, via des phénomènes osmotiques, cette variation de taille n'ayant alors évidemment aucune signification systématique.

Les études qui sont menées sur l'écologie des charophytes, notamment en Camargue, requièrent une base systématique sûre, afin de ne pas séparer ou regrouper abusivement des taxons qui pourraient présenter des écologies différentes.

Ce travail se propose d'étudier si une relation statistiquement fiable existe entre le diamètre des anthéridies des individus et leur génotype. La seconde étape, plus exploratoire, consistera en l'élaboration d'hypothèses quant au statut respectif des deux taxons *Chara aspera* et *Chara galioides*.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Sites d'étude

Nous avons étudié des individus du groupe *Chara aspera/Chara galioides* dans 5 marais temporaires de Camargue dans lesquels se développaient l'un et/ou l'autre de ces deux taxons. Ces marais, situés sur le terrain de la Réserve Naturelle de la Tour du Valat (Fig. 1), sont répartis sur une superficie de 2000 hectares environ (Fig. 2). Ces marais s'assèchent généralement à la fin du printemps et sont remis en eau avec les pluies d'automne. Leur régime hydrique est variable d'une année à l'autre en relation avec la variabilité de la pluviosité sous climat méditerranéen. Lors de la récolte des échantillons (généralement à la fin du printemps), leur conductivité était de 8, 17, 3,7, 1,2, 8,7 et 4,6 ms/cm pour respectivement, les sites 1, 2, 3, 4, 5, et 6. Ces sites abritent des communautés de plantes annuelles aquatiques composées d'herbiers à characées, dominés généralement par le groupe *Chara aspera/galioides* et, selon les



Figure 1: Situation géographique de la Réserve Naturelle de la Tour du Valat.



Figure 2: Situation des sites de prélèvement des individus de *Chara aspera/galioides* sur le domaine de la Tour du Valat.

marais, d'angiospermes comme *Ruppia maritima* ssp. *brevirostris* Verhoven, *Zannichellia pedunculata* Talavera, *Ranunculus baudotii* Godron et *Callitriche truncata* Schotsman (Grillas, 1990). La nomenclature des angiospermes suit *Flora Europea* (Tutin *et al.*, 1964), excepté pour *Ruppia maritima* (Verhoven, 1979) et le genre *Zannichellia* (Talavera *et al.*, 1986).

Les individus ont été récoltés et analysés en 1990 et en 1991. En mai 1990, 20 individus mâles ont été récoltés dans le site 1 et 10 individus mâles dans les sites 2 et 3. Dix individus femelles ont été prélevés dans chaque site.

En 1991, seuls des pieds mâles ont été collectés. La phénologie des plantes était très variable selon les sites et nous avons prélevé les échantillons à des dates différentes entre les marais afin d'obtenir des individus ayant atteint un stade de maturité optimum, avec des anthéridies de taille maximale. En 1991, le peuplement de charophytes ne s'est pas développé dans le site 2 et nous n'avons donc pas pu répéter les mesures sur ce site; dans le site 1, la mesure des anthéridies n'a pas pu être réalisée sur les individus prélevés, les anthéridies se trouvant à un stade trop avancé; les résultats du site 1 en 1991 n'ont donc pas été intégrés dans l'analyse. Nous avons récoltés 17 individus dans le site 3, 20 individus dans les sites 4, 5 et 6 (respectivement le 23 avril et le 20 mai 1991).

Les mesures d'anthéridies sont effectuées sur le verticille le plus développé qui correspondait, systématiquement, au 5ème verticille en partant de l'apex. La mesure du diamètre de toutes les anthéridies de ce verticille est réalisée à l'aide d'une vis micrométrique montée sur un objectif de microscope. Les anthéridies en bon état sont toutes mesurées, pour tous les rayons de ce verticille et en considérant le diamètre extérieur de l'anthéridie (Fig. 3).

### Electrophorèse

Gemayet (1988) a montré que la technique électrophorétique permettait de distinguer les genres, espèces et populations. L'étude présentée ici porte sur les 4 systèmes enzymatiques qui discriminent le mieux les populations.

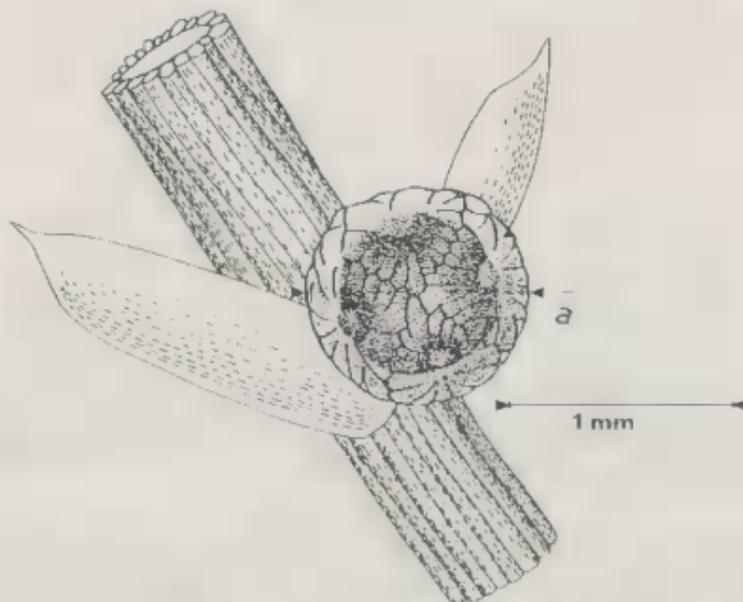


Figure 3: Mesure du diamètre de l'anthéridie. C'est le diamètre maximal de l'anthéridie qui a été mesuré (a), intégrant la zone translucide qui se trouve tout autour de la zone centrale colorée.

L'électrophorèse consiste à faire migrer des particules chargées sous l'influence d'un champ électrique. En l'occurrence, ces particules sont des protéines solubles et plus précisément des enzymes. La méthode permet de séparer les protéines ayant la même fonction enzymatique, mais des structures différentes, se traduisant par des mobilités différentes dans le champ électrique. Ces molécules protéiques isoactives enzymatiquement, mais séparables par électrophorèse, sont appelées isoenzymes. Les isoenzymes codées par les formes allèles d'un même gène sont appelées alloenzymes.

#### - Protocole adopté

Si les principes de base de l'électrophorèse permettent son application à tout type de matériel vivant, cette application nécessite néanmoins une adaptation des protocoles à chaque cas. Pour notre modèle biologique, le protocole adopté comprend les trois étapes suivantes: 1) L'extraction est réalisée par simple broyage à sec et à froid de l'ensemble du thalle de chaque individu. L'absence de phénomène d'oxydation pour le genre *Chara* rend inutile l'adjonction d'un tampon anti-oxydant. Les homogénats obtenus sont récupérés dans des microtubes, sans faire de centrifugation, et conservés au congélateur à moins 80°C jusqu'à l'analyse. 2) La migration des protéines se fait sur support d'amidon, choisi en raison de sa souplesse d'utilisation et de la variété des tampons disponibles. Les protocoles utilisés sont ceux décrits par Smithies (1955). Les conditions de migration retenues pour les quatre enzymes sont données dans le tableau I. 3) La révélation des enzymes est réalisée à l'aide d'une solution contenant le substrat spécifique de l'enzyme étudiée et des réactifs colorés. Le principe des colorations utilisées pour les révélations peut être trouvé dans Harris & Hopkinson (1976).

Le protocole utilisé dans ce travail est résumé dans le tableau II. Quatre principaux systèmes enzymatiques sont étudiés: les phosphatases acides (PAC), la phosphoglucomutase (PGM), la phosphogluco-isomérase (PGI) et l'isocitrate-déshydrogénase (IDH).

#### - Systèmes enzymatiques étudiés

Les quatre systèmes enzymatiques étudiés présentent un polymorphisme sur l'ensemble des individus.

1) Les phosphatases acides (PAC) se présentent toujours avec plusieurs bandes, en général quatre, par individu. Le nombre et le niveau de ces bandes sont constants à l'intérieur d'une population mais différent entre les populations ce qui permet de les caractériser. Ces bandes sont toujours de faible intensité et parfois même absentes, ce qui rend l'interprétation des zymogrammes extrêmement délicate. Ce système enzymatique permet cependant de distinguer les individus mâles des individus femelles: les pieds mâles présentent systématiquement une bande supplémentaire par rapport aux zymogrammes des femelles. En l'absence des organes reproducteurs, la distinction des sexes est difficile par la seule observation morphologique (Corillon, 1957). Les PAC ne permettent pas de différencier les individus mâles entre eux; ce système n'a donc pas été intégré dans l'analyse globale qui met en relation le diamètre des anthéridies et les résultats électrophorétiques.

2) Pour la phosphoglucomutase (PGM), chaque individu possède deux isoenzymes, un isoenzyme inférieur, fortement coloré, surmonté d'un isoenzyme de coloration plus faible. L'analyse d'un grand nombre d'échantillons (Gemayel & Soulié-Marsche, *in prep.*) montre que la mobilité de ces deux isoenzymes est toujours liée, ce qui permet de supposer que les PGM sont dues à l'expression d'un gène unique. Le thalle du genre *Chara* étant haploïde, la présence de ces deux bandes peut être expliquée soit par un phénomène de polyploïdisation, soit par une duplication ou amplification génique.

Tableau I. Composition des tampons utilisés pour la migration et paramètres électriques. TRIS: Tris-(hydroxyméthyl)aminométhane.

TYPE DE GEL	P'	LITHIUM-BORATE
COMPOSITION DU TAMPON	13 g d'acide borique 1,68 g de NaOH	9,51 g d'acide borique 1 g de LiOH
D'ÉLECTRODES (pont)	700 ml de H <sub>2</sub> O pH = 8,2	800 ml de H <sub>2</sub> O pH = 8,1
COMPOSITION DU TAMPON	5 g de TRIS 1,05 g d'acide borique 400 ml de H <sub>2</sub> O	2,48 g de TRIS 0,64 g d'acide citrique 360 ml de H <sub>2</sub> O
DE GEL	pH = 8,7 12% d'amidon cuisson de 90'	pH = 8,4 12,5% d'amidon cuisson de 60'
PARAMÈTRES ÉLECTRIQUES	Départ : 50-55 mA 190-210 V Fixer l'intensité jusqu'à 250 V	Départ : 80 mA 250-280 V Fixer l'intensité jusqu'à 350 V
DURÉE DE MIGRATION	6 heures	4 heures
ENZYMES ÉTUDIÉES	PGM, IDH et PAC	PGM, IDH et PGI

3) Pour l'isocitrate-déshydrogénase (IDH), il existe toujours une seule bande de coloration très intense, pour chacun des individus.

4) Pour la phosphogluco-isomérase (PGI) deux groupes de bandes sont révélés, les plus cathodiques étant les plus intensément colorées. Ces deux groupes varient de façon indépendante et correspondent par conséquent à l'expression de deux gènes distincts.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### Diamètre des anthéridies

Le diamètre de l'ensemble des anthéridies mesurées s'étend de 551 à 1026 microns. Dans les sites 1, 3 et 4, il y a à la fois des individus qui présentent des anthéridies de diamètre inférieur à 800 microns et des individus dont les anthéridies font plus que 800 microns de diamètre, en proportion variable (Cf. annexe 1).

Tableau II: Composition des solutions et protocole de révélation.

PGM	IDH	PAC	PGI
40 ml tampon GOT	50 ml tampon GOT	50 ml tampon PAC	20 ml tampon GOT
80 mg Glucose-1-P	100 mg ac. isocitrique	100 mg naphthyl ac. phos.	50 mg Fructose-6-P
1 ml MgCl <sub>2</sub> 0,5M	1 ml MgCl <sub>2</sub> 0,5M	1 ml MgCl <sub>2</sub> 0,5M	2 ml MgCl <sub>2</sub> 0,5M
20 mg de NADP	20 mg de NADP		10 mg NADP+10 mg NAD
20 mg de NBT	10 mg de NBT	coloration : 60 mg	10 mg de NBT
1 mg de PMS	1 mg de PMS	Fast-Garnet GBC	1 mg de PMS
25 µl Glucose-6-PDH			25 µl Glucose-6-PDH
Température : 40°C	Température : 40°C	Température : 37°C	Température : 37°C
Obscurité	Obscurité		Obscurité

Tampon GOT à pH8 : (Glutamate-oxaloacétate-transaminase)

24,2 g de TRIS  
10 ml d'HCl 100%  
1000 ml d'H<sub>2</sub>O déionisée

Tampon PAC à pH5 : (Phosphatase -acide)

13,6 g d'acétate de Na  
1000 ml d' H<sub>2</sub>O déionisée  
ajusté à pH5 avec ac. acétique à 100% (environ 2,4 ml)

NAD Nicotinamide Adénine Dinucléotide  
NADP Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate  
NBT Nitro blue Tétrazolium  
PMS Phénazine Méthosulfate

### Caractéristiques électrophorétiques des populations

#### Année 1990

La population du site 2 (*Chara cf. galioides*) a un aspect monomorphe pour les trois protéines enzymatiques (PGI, PGM et IDH). Seul le système rapide de la PGI (codé PGIh) présente une variabilité importante. Le système lent (codé PGIb), contrairement à ce qui est couramment observé, comporte des bandes d'intensité de coloration très faible, voire inexistantes. Ces bandes ont le même niveau pour tous les individus. Pour la PGM, 1/20 individu a une bande plus rapide (codé PGM-2). Pour l'IDH, 1/20 individu a une bande plus lente (codé IDH-1).

La population du site 3 (*Chara cf. aspera*) présente un polymorphisme plus marqué. Pour la PGM, 3/20 individus présentent 2 bandes plus séparées. Il est encore difficile d'interpréter cette image de manière satisfaisante, mais quoi qu'il en soit ces trois individus se distinguent de l'ensemble et doivent être intégrés dans l'analyse; ils sont codés PGM-3 (Fig. 4). En ce qui concerne l'IDH, on observe trois niveaux de migration, le niveau le plus lent (codé IDH-1) étant le plus fréquent (environ 50% de la population), les niveaux IDH-2 et IDH-3 en proportion égale. Pour la PGI, les deux systèmes sont polymorphes. Deux niveaux sont présents pour le système rapide PGIh:

le plus haut codé PGIh-1 et le plus bas codé PGIh-2. Pour le système lent, PGIb, on observe trois niveaux: PGIb-1, PGI-2 et PGIb-3. Un exemple d'image électrophorétique est donné pour la PGM et la PGI dans la figure 4, avec les codes de convention.

Dans la population récoltée sur le site 6, les résultats sont intermédiaires. Pour la PGM, on retrouve 3/30 individus présentant le niveau PGM-3. Pour l'IDH, les niveaux IDH-1 et IDH-2 sont conservés tandis que le niveau IDH-3 (le plus rapide) est absent. Les zymogrammes de la PGI présentent à la fois les images observées dans le site 3 (*Chara cf. aspera*) et dans le site 2 (*Chara cf. galioides*). En effet, pour le système PGIh, on retrouve les niveaux 1 et 2 mais également, chez 4 individus, la bande d'intensité très faible et pour un cas inexistante observée dans la population du site 2.

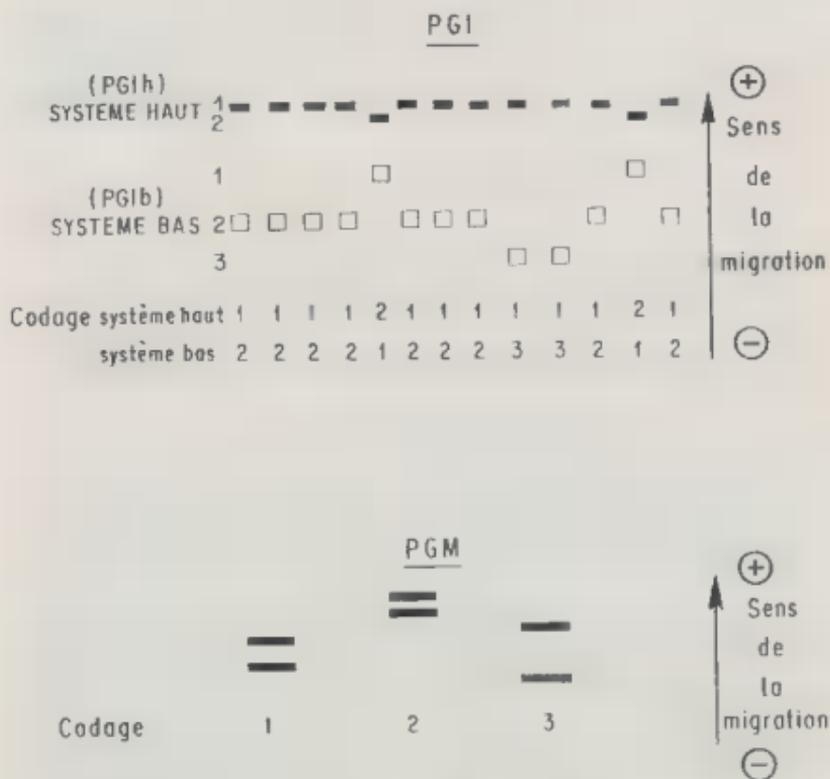


Figure 4: Codage des niveaux de migration pour les deux systèmes de la phosphogluco-isomérase (PGI) et la phosphoglucomutase (PGM). Cas d'une population originaire du site 6, pour la PGI.

### Année 1991

Les individus récoltés dans le site 5 donnent les mêmes zymogrammes que ceux provenant du site 2 en 1990: tous les locis sont monomorphes.

Les individus récoltés dans le site 4 s'avèrent monomorphes, hormis pour la PGI, polymorphe pour les deux systèmes.

Les analyses effectuées sur les individus du site 3 donnent des résultats totalement différents de ceux obtenus l'année précédente. Pour la PGM, 2/17 individus montrent une migration plus rapide (PGM-2). Pour l'IDH, tous sont au niveau IDH-2. Pour le système cathodique de la PGI (PGIb), tous les individus présentent le niveau codé PGIb-1.

### Relation entre la taille des anthéridies et les caractéristiques génétiques des individus

Le tableau III montre la répartition des individus en fonction du diamètre de leurs anthéridies, structurée en classes de 50 microns, de 475-525 à 976-1025. Les individus sont classés en fonction de leur niveau de migration pour les 4 systèmes enzymatiques étudiés. On considère les allèles PGM-1, -2 et -3; PGIh-1 et h-2, PGIb-1, b-2 et b-3; IDH-1, -2 et -3.

Ce tableau permet, en première lecture, de dégager deux groupes ou taxons:

1) Un taxon "A", caractérisé par des combinaisons du niveau 1 de la PGIh, du niveau 2 de la PGIb et des niveaux 1 ou 3 de la PGM (Tab. IV); une partie des individus présentent le niveau 3 de la PGM. Les anthéridies des individus ainsi caractérisés sont de petite taille, i.e. inférieure à 759 microns de diamètre. Ce taxon "A" se rapproche de la description de *Chara aspera* qui se trouve dans les flores.

2) Un taxon "B" composé d'individus dont le génotype est caractérisé par les allèles PGIh-2, PGIb-1 et IDH-2 (Tab. IV). Les anthéridies de ces pieds mâles mesurent  $\approx$  minimum: 685 microns de diamètre et ce taxon "B" peut être rapproché de *Chara galioides*.

L'allèle PGM-1 est très fréquent et largement réparti quel que soit le diamètre de l'individu et n'est donc pas informatif. Les allèles plus rares sont délicats à interpréter: PGM-2 se trouve dans les 2 groupes; PGIb-3 et IDH-3 pourraient être caractéristiques du taxon à petites anthéridies (A). L'histogramme de fréquences relatif aux diamètres des anthéridies (Fig. 5) confirme clairement l'existence des deux groupes constitués à partir du tableau III. La zone de chevauchement est limitée (de 676 à 775 microns) mais concerne 66% du taxon A et 10% du groupe B (Fig. 5).

Sur les 91 individus mesurés et étudiés par électrophorèse, 15 constituent le taxon A et 57 le taxon B. Le diamètre moyen des anthéridies est significativement différent (\*\*\*, t-test) entre ces deux groupes et leurs intervalles de confiance s'excluent l'un et l'autre (Tab. IV). Il reste 19 individus non classés dans l'un ou l'autre des groupes dont le génotype n'est pas caractéristique du taxon A ou B (Tab. IV). Le diamètre moyen des anthéridies permet de classer une partie des individus restants: 4 d'entre eux possèdent des anthéridies dont le diamètre est inclus dans l'intervalle de confiance du taxon A et la taille des anthéridies de 4 autres individus est comprise dans l'intervalle de confiance du taxon B (Tab. IV et Tab. V).

Ces deux taxons sont sympatriques dans les sites 1, 3 et 4,  $\approx$  proportion variable (Tab. V). Les sites 2 et 5 contiennent uniquement des individus avec de grandes anthéridies (Taxon B).

Tableau III: Synthèse des résultats morphologiques (diamètre des anthéridies) et biochimiques (niveaux de migration).

Chaque colonne correspond à une classe de diamètre des anthéridies de 50 microns et les lignes indiquent les différents niveaux de migration pour les 4 systèmes enzymatiques étudiés. Chaque case correspond à une gamme de diamètre des anthéridies (en microns) et à une caractéristique biochimique; le nombre d'individus concernés est indiqué. Les cases ombrées correspondent aux regroupements qui peuvent être réalisés *a priori*.

	475/525	526/575	576/625	626-675	676-725	726-775	776-825	826-875	876-925	926-975	976-1025
PGM 1	1	2	3	3	8	10	14	8	16	14	4
PGM 2								1	1	1	
PGM 3			1			2	1				
PGIh 1	1	2	4	2	8	6	4		2		2
PGIh 2				1	1	6	11	9	15	15	2
PGIb 1					2	5	12	9	17	15	4
PGIb 2	1	1	3	3	7	7	3				
PGIb 3			1								
IDH 1			2	3	6	3	1				
IDH 2		2			3	9	14	9	17	15	4
IDH 3	1	2									

A=

B=

Tableau IV: Caractéristiques stationnelles, morphologiques et biochimiques des individus formant les taxons A (cf. *Chara aspera*) et B (cf. *Chara galioides*).

1: le génotype de chaque individu, ou groupe d'individus, est défini par le niveau de migration des enzymes PGM, PGIh, PGIb, IDH, indiqué dans cet ordre. Un point d'interrogation montre que l'enzyme n'est pas diagnostique.

taxon	provenance	n	Diamètre moyen (microns) Intervalle de confiance à 5%	Génotypes représentés
A	Sites 1 et 3: Année 1990	15	654 [617-691]	3121
				?121 ?123 ?123
B	Sites 1, 2 et 3: Année 1990	57	876.7 [857.5-896]	7212
	Sites 4 et 5: Année 1991			

Il reste 11 individus pour lesquels ni le résultat des électrophorèses ni le diamètre des anthéridies, intermédiaires entre les taxons A et B, ne permettent de statuer. Ils proviennent de plusieurs sites et sont présents les deux années de prélèvement (Tab. VI). Ces 11 individus pourraient constituer des hybrides de A et B. Cette hypothèse n'est cependant pas vraisemblable au vu des génotypes invoqués; les deux systèmes enzymatiques discriminant les taxons A et B et possédant trois allèles sont PGIb et IDH. Les formes alléliques minoritaires, PGIb-3 et IDH-3 sont censées caractériser les hybrides. Or aucun des 11 individus non classés ne présente au moins l'une ou l'autre de ces formes alléliques (Tab. VI).

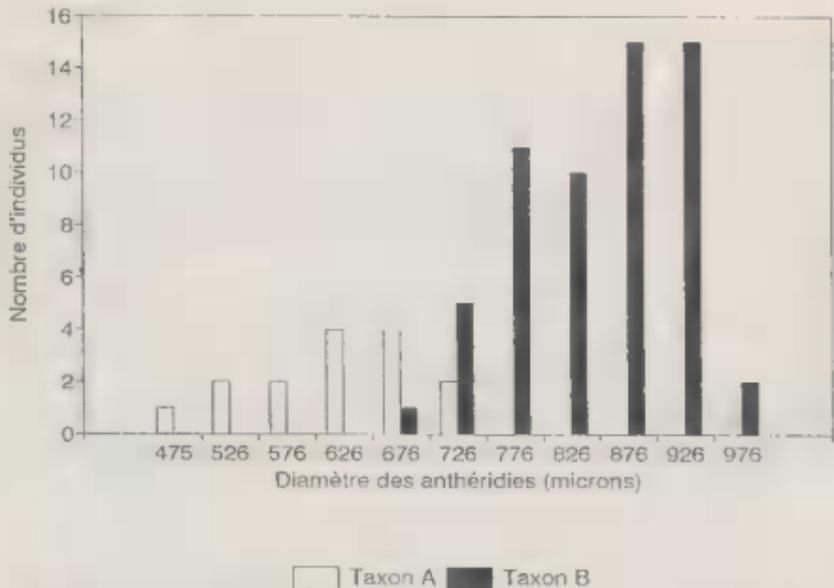


Figure 5: Histogramme de fréquences des individus par classes de diamètre des anthéridies. Seuls sont représentés les individus qui appartiennent clairement au taxon A ou B, par leur caractéristiques électrophorétiques. Le nombre d'individus est indiqué par classe de diamètre de 50 microns. Pour chaque classe, seule la borne inférieure est indiquée. Les individus du taxon A sont représentés par des barres vides et ceux du taxon B par des barres noires. On notera la zone de recouvrement entre ces deux taxons.

Une hypothèse explicative pourrait être proposée: les deux taxons A et B, comme définis plus haut, sont sympatriques et pourraient être interféconds. En effet, les allèles de forte fréquence dans un taxon (par exemple PGIh-1 dans le taxon A et IDH-2 dans le taxon B) sont également présents bien que beaucoup plus rares dans l'autre taxon. Les groupes A et B pourraient représenter deux sous-espèces ou variétés, les forces de sélection pouvant jouer sur la proportion de l'une et de l'autre dans les différents sites. Parmi les facteurs d'environnement susceptibles de sélectionner un génotype plus que l'autre, la salinité est sans doute importante; le taxon B, s'apparentant à *Chara cf. galioides* est considéré comme plus halophile que *Chara aspera* (i.e. taxon A) (Corillion, 1957). *Chara aspera* est d'ailleurs absent des sites 2 et 5 qui sont les plus salés. La répartition des deux taxons ne peut cependant être expliquée de façon satisfaisante par le facteur salinité uniquement. D'autres contraintes d'environnement comme le régime hydrique pourraient intervenir.

### CONCLUSION

Les résultats acquis dans ce travail permettent d'apporter des réponses partielles quant au statut respectif de *Chara aspera* et *Chara galioides*. Nous avons pu mettre en évidence une relation statistiquement fiable entre deux séries de génotypes et

Tableau V: Caractéristiques stationnelles, morphologiques et biochimiques des 11 individus qui peuvent être rattachés aux taxons A ou B selon le diamètre moyen de leurs anthéridies (en microns).<sup>1</sup>: voir légende du tableau IV pour la définition des génotypes.

Provenance	Génotypes <sup>1</sup>	Diamètre des anthéridies	Taxon
Site 2, 1990	1 1 1 2	1004	B
		900	B
		1026	B
Site 3, 1990	1 2 2 1	673	A
		580	A
Site 4, 1991	1 1 2 2	596	A
		686	A
Site 6, 1991	1 1 1 2	901	B

Tableau VI: Caractéristiques stationnelles morphologiques et biochimiques des 11 individus "inclassables" dans les taxons A ou B.<sup>1</sup>: voir légende du tableau IV pour la définition des génotypes.

Provenance	n	Diamètre anthéridie (microns)	Génotypes <sup>1</sup>
Site 1, 1990	1	742	1 1 2 2
Site 3, 1990	2	781	3 2 2 1
		753	3 2 2 1
Site 4, 1991	7	777	1 1 2 2
		696	1 1 2 2
		736	1 1 2 2
		770	1 1 2 2
		792	1 1 2 2
		756	1 1 2 2
		818	1 1 1 2
Site 6, 1991	1	823	1 1 1 2

deux classes de diamètre d'anthéridie. La distinction de *Chara aspera* et *Chara galioides* proposée dans les flores, sur la base du diamètre de l'appareil reproducteur mâle, est fondée. La limite retenue usuellement pour séparer les deux taxons (soit inférieur à 600 microns pour *Chara aspera* et supérieur à 800 ou 850 microns pour *Chara galioides*) est cependant remise en cause. L'intervalle de confiance de *Chara aspera* intègre notamment des diamètres d'anthéridies qui avoisinent 700 microns et qui sont donc de beaucoup plus grande taille que celle décrite dans la littérature pour ce taxon. Les deux groupes présentent une zone de recouvrement pour le diamètre des anthéridies, diamètre qui évolue selon un continuum. La fiabilité de ce paramètre pour la détermination d'individus isolés ne paraît alors pas évidente, mais reste élevée pour des études de dynamique des populations. Il conviendrait à l'avenir de quantifier expérimentalement la part de variabilité morphologique de l'anthéridie qui peut être attribuée à la concentration ionique; cela pourrait permettre de mettre en évidence des gammes de diamètre avec un moindre recouvrement entre les deux taxons, pour une salinité donnée.

Nous avons proposé que les deux taxons soient interféconds pour expliquer l'absence de fixation de la plupart des allèles. Malgré la difficulté pour réaliser des croisements contrôlés entre charophytes (Guerlesquin, comm. pers.), cette méthode représente une voie prometteuse et incontournable pour la compréhension de la biologie de ces populations d'algues et la clarification de leur systématique.

Ce travail fournit la base nécessaire à la recherche de critères morphologiques supplémentaires pour distinguer *Chara aspera* de *Chara galioides*. Pour être fiables et efficaces, les critères morphologiques devront:

- présenter le plus faible chevauchement possible d'un taxon à l'autre.
- permettre également de séparer les individus femelles de chaque taxon.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement Mesdames Nicole Pasteur, Ingeborg Soulié-Märsche ■ Monsieur François Carzeflis, pour les discussions ■ suggestions dont ils nous ont fait part au cours de ce travail. Nous remercions également les deux correcteurs d'une première version de ce manuscrit pour leurs critiques constructives. Ce travail est la contribution ISEM n°93-016.

#### RÉFÉRENCES

- AGUESSE P. ■ BIGOT L., 1960 - Observations floristiques et faunistiques sur ■ étang de moyenne Camargue: la Baisse Salée de la Tour du Valat. *Vie et milieu* 8: 284-307.
- CORILLION R., 1957 - *Les charophycées de France et d'Europe occidentale*. Otto Koeltz Verlag, Koenigstein-Taunus, reprint 1972, 499 p.
- CORILLION R., 1961 - Les stations à *Tolypella hispanica* Nordstedt (charophycées) du territoire français. *Rev. Algol.* n. s. 6: 33-37.
- CORILLION R. & GUERLESQUIN M., 1959 - Observations charologiques (ouest, centre et sud-est de la France). *Bull. Soc. Sci. Bretagne* 34: 209-215.
- GEMAYEL P., 1988 - Approche d'une systématique biochimique chez les charophytes. *Cryptogamie, Algol.* 9: 73-82.
- GRILLAS P., 1990 - Distribution of submerged macrophytes in the Camargue in relation to environmental factors. *J. Veget. Sci.* 1: 393-402.
- GUERLESQUIN M., 1958 - *Recherches sur l'anthéridie chez les charophycées. Etude morphologique, biologique et systématique*. Diplôme d'Etudes Supérieures, faculté des Sciences de Toulouse, 106 p. dactyl.
- GUERLESQUIN M. & PODLEJSKI V., 1980 - Characées et végétaux submergés et flottants associés dans quelques milieux camarguais. *Naturalia Monspelienisia*, Sér. Bot. Fasc. 36: 1-20.
- HARRIS H. & HOPKINSON D.A., 1976 - *Handbook of enzyme electrophoresis in human genetics*. New York. North Holland Publishing Company, Inc.
- HY F., 1913 - Les characées de France. *Bull. Soc. Bot. France*, mém. 26, T. LX, 50 p.
- MOLINIER R. & TALLON G., 1970 - Prodrôme des unités phytosociologiques observées en Camargue. *Bull. Mus. Hist. Nat. Marseille* 30: 5-110.
- SMITHIES O., 1955 - Zone electrophoresis in starch gels. Group variations in the ■■■■ proteins of normal human adults. *Biochem. J.* 61: 629-641.

- SOULIÉ-MÄRSCHÉ I., 1979 - *Etude comparée de gyrogonites de charophytes actuelles et fossiles et phylogénie des genres actuels*. Thèse Doctorat d'état, Université Sciences ■ Techniques du Languedoc, Montpellier, 341 p.
- TALAVERA S., GARCIA MURILLA P. & SNIH H., 1986 - Sobre el genero *Zannichellia* (Zannichelliaceae). *Lagascalia* 14(2): 241-271.
- TALLON G., 1957 - Charophycées de Camargue. *Terre et Vie* 11: 120-121.
- TUTIN T.G., HEYWOOD V.H., BURGESS N.A., MOORE D.M., VALENTINE D.H., WALTERS S.M. & WEBS D.A., 1964 ■ 1980 - *Flora Europeu*. Cambridge Univ. Press, Cambridge, 5 volumes, 2146 pages + annexes.
- VERHOEVEN J.T.A., 1979 - The ecology of *Ruppia* dominated communities in Western Europe I. Distribution of *Ruppia* representatives in relation to their autecology. *Aquatic Botany* 6: 197-268.
- WOOD R.D. & IMAHORI K., 1964-1965 - *A revision of the Characeae: Iconograph of the Characeae, Vol. I, 1964; Monograph of the Characeae, Vol. II, 1965, 904 p.*, Weinheim J., J. Cramer.

## Annexe 1:

Résultats des électrophorèses et diamètre moyen des anthéridies de chaque individu analysé.

SITE	ANNEE	PGM	PGIh	PGIb	IDH	Diamètre en micron						
1	1990	1	1	2	1	702						
						635						
						696						
						607						
						669						
						709						
						716						
						678						
						759						
						692						
						1	1990	1	2	1	2	926
												897
												940
788												
933												
1	1990	3	1	2	1	607						
						726						
2	1990	1	1	2	2	742						
						873						
						904						
						945						
						969						
						962						
						852						
						2	1990	1	1	1	2	900
												1004
												1026
3	1990	2	2	1	2	934						
						564						
						510						
						542						
						3	1990	3	2	2	1	781
												753
						3	1990	2	2	1	2	866
												673
						3	1990	1	1	3	2	580

4	1991	1	2	1	2	803
						825
						831
						753
						799
						792
						827
						815
						806
						753
		1	1	2	2	777
						596
						696
						736
						770
						792
		1	1	1	2	818
						686
5	1991	1	2	1	2	685
						865
						1012
						837
						937
						950
						912
						1015
						887
						943
						946
921						
915						
800						
930						
975						